

恶性疟原虫/间日疟原虫胶体金法快速检测试剂盒 稳定性及特异性评估方法研究

高俊松

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

[摘要] 为评价自制恶性疟原虫/间日疟原虫胶体金法快速检测试剂盒的稳定性及特异性, 采用自制试剂盒与市售试剂盒对全血参考品进行分析性能评估、交叉干扰物的影响评估、稳定性评估及临床应用效果评估实验。结果显示, 自制试剂盒具有较好的检测性能、对不同干扰物的检测未出现交叉反应影响, 自制试剂盒具有较好的实时稳定性, 自制试剂盒与市售试剂盒具有同样的临床效果。

[关键词] 恶性疟原虫 间日疟原虫 胶体金法 试剂盒

[中图分类号] R382.3+1

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-8683(2019)03-0003-04

1 概述

艾滋病、结核和疟疾被称为全球性的三大传染病^[1]。《2017 年世界疟疾报告》表明, 2016 年全球 91 个国家共计报告疟疾病例 2.16 亿例, 死亡病例达到 44.5 万^[2]。危害人体的疟原虫有 4 种: 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*, p.f)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*, p.v)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*, p.m)和卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*, p.o)。其中对人体危害最大的是恶性疟原虫, 其次是间日疟原虫^[2]。快速准确的诊断是减少疟疾并发症、致死率及社区传播的关键因素^[4]。为此, 开发和建立快速有效的疟疾诊断方法和试剂盒已经成为疟疾防治问题的关键。目前疟疾实验室诊断法主要包括传统的镜检法、分子生物学诊断方法及免疫学方法等。相对前两种方法而言, 免疫学方法中的快速诊断试剂盒具有简易、快速、结果容易判断等优点, 完全具备普通家庭及野外的早期诊断的条件。但要求快速诊断试剂盒具有试剂稳定、特异性高等优点, 为此我们针对胶体金法试剂盒的稳定性、特异性评估研究了一系列完整性的方法和标准, 并将该方法和标准应用于新型产品的评价及产品临床效果判别。

本文主要将制备的新产品从分析性能评估、交叉干扰物影响评估、稳定性评估及临床效果评估等方面开展

研究, 根据评估的结果阐述新产品的应用价值。

2 材料与方法

2.1 试剂盒

自制试剂盒(其制备方法如图 1 所示)共 3 个批次, 分别是 XM15061601、XM15061602、XM15061603。

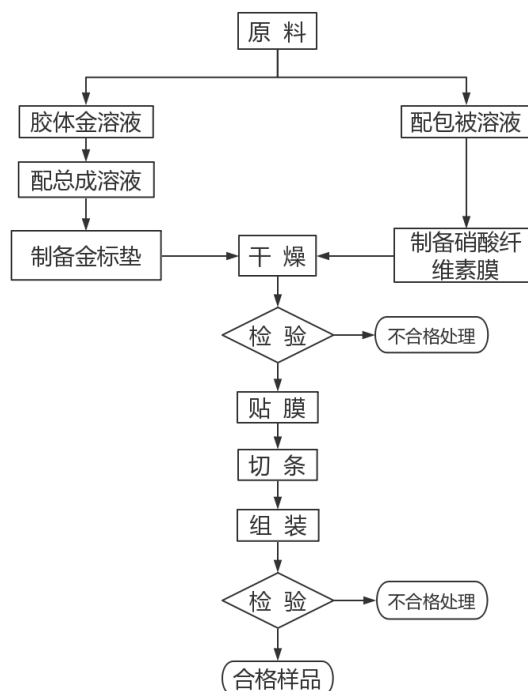


图 1 自制试剂盒工艺流程

2.2 参考品

市售胶体金法的恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂（批号 1507041702）；恶性疟原虫抗原检测试剂盒用全血参考品（批号 PF01）；间日疟原虫抗原检测试剂盒用全血参考品（批号 PV1501）。

2.3 方法

2.3.1 分析性能评估实验

采用前述三批号的自制试剂盒，用于评价恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂（胶体金法）对参考品（PF1501 和 PV1501）的检出结果，包括最低检出量、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、重复性等各项指标，其要求如表 1 所示。

表 1 性能分析评估实验要求

检测项		标准要求
PF 项	最低检出量	最低检出量应该不高于 100 个虫/μL 全血 阳性参考品符合率
	阳性参考品符合率	阳性参考品符合率（+/+）应为 8/8
	阴性参考品符合率	阴性参考品符合率（-/-）应为 10/10
	重复性	平行检测 10 次重复性参考品，应均为 阳性结果，显色均一
PV 项	最低检出量	最低检出量应该不高于 100 个虫/μL 全血 阳性参考品符合率
	阳性参考品符合率	阳性参考品符合率（+/+）应为 6/6
	阴性参考品符合率	阴性参考品符合率（-/-）应为 10/10
	重复性	平行检测 10 次重复性参考品，应均为 阳性结果，显色均一

2.3.2 交叉干扰物的影响评估实验

采用批号为 XM15061601 的自制试剂盒检测潜在干扰物标本，用于评价潜在的干扰物标本，如三日疟阳性标本、卵形疟阳性标本、登革热阳性标本、结核分枝杆菌阳性标本、艾滋病阳性标本、TP 阳性标本等，对恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂（胶体金法）的检测结果是否存在影响。潜在的干扰物标本包括其他疾病阳性标本（同时恶性疟原虫、间日疟原虫为阴性）：

4 例三日疟阳性标本、4 例卵形疟阳性标本、5 例登革热阳性标本、10 例艾滋病阳性标本、15 例梅毒阳性标本、10 例结核分枝杆菌抗体阳性、6 例弓形虫阳性、20 例乙肝阳性标本、10 例丙肝阳性标本、5 份类风湿因子阳性标本。

2.3.3 稳定性评估实验

采用前述三批号的自制试剂盒，用于评价恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂（胶体金法）的实时稳定性。实验方法包括：①将各批次试剂在 4~10℃、28±2℃ 放置，直至 26 个月，每隔 2 个月取出试剂，检测参考品，观察稳定性情况。②将各批次试剂在温度范围 10~25℃ 条件下放置，直至 26 个月，每隔 2 个月取出试剂，检测参考品，观察稳定性情况。实时稳定性的要求见表 1。

2.3.4 临床评估实验

采用批号为 XM15061601 的自制试剂盒和市售的试剂盒（批号为 1507041702）进行平行检测临床标本，用于确定自制试剂盒与已批准上市对照试剂之间的差异，评价该试剂的应用意义。

3 实验结果与讨论

3.1 分析性能评估结果

试剂批号分别为 XM15061601、XM15061602 及 XM15061603 的自制试剂盒进行了实验，XM15061601 批号的检测结果如表 2 所示，XM15061602 及 XM15061603 得到与 XM15061601 同样的结果，在此不重复列出。表 2 中，PF01 参考品为 100 个虫/μL 全血 PF 参考品，PV01 参考品为 100 个虫/μL 全血 PV 参考品，“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

根据表 2 的实验结果，对照表 1 要求，可以清晰得出批次 XM15061601 的自制试剂盒的分型性能符合要求，而根据另外两批次样品的实验结果，也可得出自制试剂盒均符合要求。从而表明自制的试剂盒能满足分析性能的要求，可进一步对所制备的试剂盒进行交叉干扰物影响、稳定性及临床性能方面的评估实验，以确定其是否可作为临床实验产品。

表 2 批号为 XM15061601 自制试剂盒的性能评价结果

项目	类别	编号及实验结果									
PF	样品	PF0	—	PFP1	PFP2	PFP3	PFP4	PFP5	PFP6	PFP7	PFP8
	结果	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	编号	PFN1	PFN2	PFN3	PFN4	PFN5	PFN6	PFN7	PFN8	PFN9	PFN10
	结果	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PV	编号	PV0	—	PVP1	PVP2	PVP3	PVP4	PVP5	PVP6	—	—
	结果	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—
	编号	PVN1	PVN2	PVN3	PVN4	PVN5	PVN6	PVN7	PVN8	PVN9	PVN10
	结果	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

3.2 交叉干扰物的影响评估实验结果

批号为 XM15061601 自制试剂盒对三日疟、卵形疟、登革热、艾滋病、梅毒、结核分枝杆菌、弓形虫、甲肝、乙肝、丙肝等阳性干扰物标本的检测结果显示。

表 3 批号为 XM15061601 自制试剂盒对交叉干扰物的影响检测结果

恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂检测结果				
	标本数量	阳性结果数量	阴性结果数量	是否产生干扰
三日疟阳性标本	4	0	4	否
卵形疟阳性标本	4	0	4	否
登革热阳性标本	5	0	5	否
艾滋病阳性标本	10	0	10	否
梅毒阳性标本	15	0	15	否
结核分枝杆菌抗体阳性	10	0	10	否
弓形虫阳性	6	0	6	否
甲肝阳性标本	10	0	10	否
乙肝阳性标本	20	0	20	否
丙肝阳性标本	10	0	10	否
类风湿因子阳性标本	5	0	5	否

实验结果表明，潜在的干扰物如三日疟阳性标本、卵形疟阳性标本、登革热阳性标本、艾滋病阳性标本、梅毒阳性标本、结核分枝杆菌抗体阳性标本、弓形虫阳性标本、甲肝阳性标本、乙肝阳性标本、丙肝阳性标本，对自制批号为 XM15061601 的恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂盒检测结果没有交叉反应影响。

3.3 稳定性评估实验结果

为了评价自制试剂盒的实时稳定性，进行了一系列实验，包括：（1）将各批试剂放置 4~10℃ 条件中，每隔 2 个月取出，用参考品检测，直至 26 个月。（2）将各批试剂放置 10~25℃ 条件中，每隔 2 个月取出，用参考品检测，直至 26 个月。（3）将各批试剂放置 28±2℃ 条件中，每隔 2 个月取出，用参考品检测，直至 26 个月。

结果显示，自制试剂盒在 4~10℃、10~25℃、28±2℃ 条件下放置 26 个月，所评估的恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂（胶体金法）仍能符合参考品的检定要求。因此，可将试剂效期定为 4~30℃、24 个月。

3.4 临床评估实验结果

采用自制试剂盒和已上市的同类产品作为对照试剂，平行检测临床标本。记录并计算考核试剂与对照试剂的阳性和阴性符合率，比较考核试剂与已上市同类产品是否存在差异。恶性疟原虫抗原项(Pf)检测结果如表 4，间日疟原虫抗原项(Pv)检测结果如表 5 所示。

表 4 批号为 XM15061601 自制试剂盒临床 Pf 的检测结果

		自制试剂盒检测结果		总体
		阳性	阴性	
已上市对照试剂	阳性	142	1	143
检测结果	阴性	5	852	857
总体		147	853	1000
符合率		99.30%	99.42%	99.40%

$$P_a=(142+8520)/1000=0.994$$
$$P_e=[(142+1)(142+5)+(852+1)(852+5)]/1000^2=0.7520$$
$$Kappa=(P_a-P_e)/(1-P_e)$$
$$=(0.993-0.7520)/(1-0.7520)=0.97>0.75$$

这表明所评估的自制试剂与已上市同类对照试剂具有较高的一致性。

表 5 批号为 XM15061601 自制试剂盒
临床 Pv 的检测结果

间日疟原虫抗原项		考核试剂检测结果		总体
		阳性	阴性	
已上市对照试剂 检测结果	阳性	167	1	168
	阴性	6	826	832
总体		173	827	1000
符合率		99.40%	99.28%	99.30%

$$P_a=(167+826)/1000=0.993$$
$$P_e=[(167+1)(167+6)+(826+1)(826+6)]/1000^2=0.7171$$
$$Kappa=(P_a-P_e)/(1-P_e)$$
$$=(0.993-0.7171)/(1-0.7171)=0.98>0.75$$

这表明所评估的考核试剂与已上市同类对照试剂具有较高的一致性。

从表 4 和表 5 可见,自制试剂盒与已上市同类对照试剂盒临床应用结果具有较高一致性。

3.5 讨论

从自制试剂盒的检测性能评估实验结果可知,自制试剂盒具有较好的检测性能,满足分析性能的要求。进一步通过潜在的交叉干扰物检测评估实验,自制试剂盒

对于潜在的干扰物如三日疟阳性标本、卵形疟阳性标本、登革热阳性标本、艾滋病阳性标本、梅毒阳性标本、结核分枝杆菌抗体阳性标本、弓形虫阳性标本、甲肝阳性标本、乙肝阳性标本及丙肝阳性标本的检测结果没有出现交叉反应影响。

此外,考察了自制试剂盒实时稳定性,实验结果表明自制试剂盒在 4~10℃、10~25℃、28±2℃条件下放置 26 个月,所评估的恶性疟原虫/间日疟原虫抗原检测试剂(胶体金法)仍能符合参考品的检定要求。最后通过临床应用评估,自制试剂盒与市售试剂盒经过一致性检验(Kappa=0.97),两种试剂盒对恶性疟原虫抗原项(Pf)的检测结果高度一致。同时还经过一致性检验(Kappa=0.98),两种试剂盒对间日疟原虫抗原项(Pv)的检测结果也具有极高的一致性。以上分析结果表明,自制试剂盒具有与市售产品同样的效果,满足分析性能及各方面的指标要求。

参考文献:

[1] 周水森,王漪,李雨.2010 年全国疟疾疫情分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2011,29(6):401-403.

[2] World Health Organization. World malaria report 2017[R]. Geneva: WHO, 2017.

[3] 牟昀珊,李璐杰,吴银娟,等.疟原虫青蒿素耐药分子机制探索[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(6):636-642.

[4] 李欢.SYBR Green 实时 PCR 检测恶性疟原虫与间日疟原虫方法的建立[D].长沙:中南大学,2014.